

Boletim de Pesquisa 182 **e Desenvolvimento**

ISSN 1676 - 340
Dezembro, 2007

**Aumento da atividade do baculovirus
AgMNPV-2D com o uso do branqueador
óptico *Blankophor P167***



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 182

Aumento da atividade do baculovirus AgMNPV-2D com o uso do branqueador óptico *Blankophor P167*

Filipe Israel Azevedo
Lorena Carvalho de Souza
Cláudia Brod Siqueira
Zilda Maria A. Ribeiro
Marlinda L. Souza
Maria Elita B. Castro

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2007

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*
Membros: *Arthur da Silva Marante*
Maria de Fátima Batista
Maurício Machain Franco
Regina Maria Dechechi Carneiro
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares de Campos Carneiro
Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*
Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*
Editoração eletrônica:

1ª edição

1ª impressão (2007):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

A 925 Aumento da atividade do baculovirus AgMNPV-2D com o uso do branqueador óptico *Blankophor P167* / Felipe Israel Azevedo ... [et al.]. -- Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.
12 p. -- (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 - 1340; 182).

1. *Anticarsia gemmatilis* - Baculovirus. 2. Branqueadores ópticos. 3. Bioensaios. 4. Mortalidade. 5. Atividade inseticida. I. Azevedo, Felipe Israel. II. Série.

579.2436 - CDD 21.

SUMÁRIO

Introdução	7
Material e Métodos	7
Referências Bibliográficas	9
Resultados e Discussão	8

Aumento da atividade do baculovirus AgMNPV-2D com o uso do branqueador óptico *Blankophor P167*

Filipe Israel Azevedo¹
Lorena Carvalho de Souza²
Cláudia Brod Siqueira³
Zilda Maria de Araújo Ribeiro⁴
Marlinda Lobo de Souza⁵
Maria Elita Batista de Castro⁵

Resumo

A lagarta *Anticarsia gemmatalis* é considerada uma das pragas mais importantes da cultura da soja. Portanto, o controle dessa praga constitui um componente chave para assegurar uma produção sustentável de soja de alta qualidade com o mínimo de perdas econômicas. O uso de baculovirus como biopesticida tem tornado uma interessante alternativa ao controle químico principalmente pela sua eficácia e segurança para humanos e outros organismos não-alvos. Estudos anteriores têm demonstrado que branqueadores ópticos, além de serem efetivos protetores de radiação UV, podem melhorar a atividade inseticida dos baculovirus. No presente estudo diferentes concentrações de AgMNPV-2D ($2,6 \times 10^5$; $1,3 \times 10^6$; $6,5 \times 10^6$ and $3,2 \times 10^7$ OB/ml), com e sem branqueador, foram avaliadas por bioensaios conduzidos em laboratório para testar o efeito do composto químico na atividade viral. O branqueador *Blankophor P167* em uma concentração de 1% foi misturado ao vírus e alíquotas de 50 μ l da suspensão resultante foram pipetados na superfície da dieta. Cada bioensaio foi realizado em triplicata. A concentração letal (LC₅₀) e tempo letal (LT₅₀) foram determinados por análise de Probit. Outros parâmetros como taxa de mortalidade (%), tempo de morte (TM) e atividade viral (A) foram também mensurados. Todos parâmetros avaliados foram afetados com a adição do branqueador. A atividade de AgMNPV na lagarta foi aumentada por 39 vezes resultando em alta mortalidade larval e redução do tempo letal. Esses resultados indicam que o *Blankophor P167* pode ser um importante adjuvante viral para uso em formulações derivadas de baculovirus.

Palavras-chave: Baculovirus, *Anticarsia gemmatalis*, branqueadores ópticos, bioensaios, mortalidade, atividade inseticida.

¹Graduando em Biologia, Universidade de Brasília/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

²Graduando em Biologia, Centro Universitário de Brasília/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³Eng. Agrônoma, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴Bióloga, MSc, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁵Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Abstract

The velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, is considered one of the most important pests of soybean crop. Thus, the control of this pest is a key component to ensure a sustainable high quality production of soybean with minimal economic losses. The use of baculovirus as biopesticide has become an interesting alternative to chemical control mostly by its efficacy and safety for humans and others nontarget organisms. Previously studies have demonstrated that optical brighteners, in addition to being effective UV radiation protectants, can improve the insecticidal activity of baculoviruses. In the present study different concentrations of the AgMNPV-2D virus ($2,6 \times 10^5$; $1,3 \times 10^6$; $6,5 \times 10^6$ and $3,2 \times 10^7$ OB/ml), with and without brightener, were evaluated by bioassays conducted in laboratory to test the effect of the chemical compound on virus activity. The *Blankophor P167* brightener at a concentration of 1% was mixed to the virus and 50- μ l aliquots of the resulting suspension were pipetted onto the diet surface. Each bioassay was performed in triplicate. The lethal concentration (LC_{50}) and lethal time (LT_{50}) were determined by probit analyses. Other parameters as rate of mortality (%), time of death (TM) and virus activity (A) were also measured. All the parameters evaluated were affected with the addition of the brightener. The activity of AgMNPV on the caterpillar was enhanced by 39-fold resulting in high larval mortality and reduction of the time to death. These results indicate that the *Blankophor P167* may be an important viral adjuvant for use in baculovirus formulations.

Key Words: Baculovirus, *Anticarsia gemmatalis*, optical brighteners, mortality, insecticidal activity, bioassay.

Introdução

Os Baculovirus constituem um grupo de vírus pertencentes à família *Baculoviridae* que infectam várias ordens de insetos, sendo na sua maioria encontrados na ordem Lepidoptera. São subdivididos taxonomicamente em dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV) (THEILMANN et al., 2005). Os NPV replicam-se no núcleo da célula infectada ocorrendo formação de corpos de oclusão poliédricos contendo, em geral, vários nucleocapsídeos por envelope. Os GV caracterizam-se pela formação de uma única partícula viral oclusa em uma matriz protéica oval chamada grânulo, que têm sua replicação em meio celular e citoplasmático após ruptura da membrana nuclear. Os vírus ocorrem naturalmente no campo podendo ser utilizados como alternativas ao uso de inseticidas químicos, pois possuem alta especificidade, conferindo total segurança ao homem e não representando riscos ao meio ambiente.

Entre as estratégias desenvolvidas visando maior aplicação dos baculovirus como bioinseticidas está o uso de branqueadores ópticos que, além de apresentarem grande potencial como agentes protetores dos vírus contra a exposição à luz ultravioleta (UV), têm-se mostrado capazes de aumentar a atividade viral. Essas substâncias químicas ao serem diluídas no vírus podem atuar na membrana peritrófica do intestino médio da lagarta tornando-a mais porosa facilitando, assim, a entrada dos corpos de oclusão no intestino resultando em uma maior taxa de mortalidade das lagartas (HAMM e SHAPIRO, 1992; SHAPIRO e ROBERTSON, 1992; DOUGHERTY et al. 1996; SHAPIRO e ARGAUER, 2001, MARTINEZ et al., 2003). Os branqueadores ópticos, alteram o pH do intestino médio do inseto e bloqueia o impedimento da infecção primária pelas células levando a uma maior probabilidade da infecção quando comparada com o vírus sozinho (SHEPPARD et al., 1994; WASHBURN et al., 1998).

O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito do branqueador óptico *Blankophor P167* na atividade do baculovirus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* com base na determinação dos parâmetros de mortalidade larval.

Material e Métodos

Insetos, vírus, branqueador óptico - Larvas de *Anticarsia gemmatalis*, em 3º/4º instar, foram obtidas do Laboratório de Criação de Insetos do Núcleo Temático de Controle Biológico (NTCB) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN, Brasília-DF. O vírus utilizado foi um clone do baculovirus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* - AgMNPV-2D (JOHNSON e MARUNIAK, 1989) disponível no Laboratório de Virologia de

Insetos do NTCB. O branqueador óptico testado foi o *Blankophor P167* (Bayer) diluído em água destilada estéril (concentração final 1%).

Purificação de partículas virais (método utilizado de acordo com o descrito por MARUNIAK, 1986) - Lagartas *Anticarsia gemmatilis* infectadas por AgMNPV-2D foram maceradas em tampão de homogeneização (ácido ascórbico 1%; SDS 2%; Tris 0,01M pH 7,8; EDTA 0,001M pH 8,0), filtradas em camadas de gazes. A suspensão foi então centrifugada a 10.000rpm /15min a 4°C em rotor SS 34. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 10ml de tampão TE (Tris-HCl 10mM pH 8,0 e EDTA 1mM pH 8,0), sendo novamente centrifugado a 12.000rpm /12min em mesma temperatura e rotor que a centrifugação anterior. Descartado o sobrenadante, o pellet foi ressuspenso em TE e 5ml deste material foram submetidos a ultracentrifugação (24.000rpm /40min/4°C, rotor AH 627) em gradiente de sacarose de 40 a 60% (densidade de 1,17 a 1,30g/ml) para purificação das partículas virais OB. A banda de OB formada no terço inferior do tubo foi coletada com uma pipeta Pasteur e diluída 4 vezes em TE. Após uma centrifugação de 12.000rpm/15min/4°C (rotor SS 34), o pellet foi ressuspenso em água e armazenado a -20°C. Essas partículas foram quantificadas utilizando hemacitômetro de Neubauer para posterior diluição nas concentrações planejadas para realização dos bioensaios.

Bioensaios - Um teste preliminar foi conduzido na concentração viral de $2,6 \times 10^5$ OB/ml e então aplicado um fator 5x no aumento das concentrações posteriores. Assim, 4 concentrações foram testadas (OB/ml): $2,6 \times 10^5$, $1,3 \times 10^6$, $6,5 \times 10^6$ e $3,2 \times 10^7$. O branqueador *Blankophor P167* foi diluído no vírus AgMNPV na concentração final 1% (MORALES et al., 1997). O volume final de inóculo foi de 50µl aplicados em discos ($\sim 0,5 \text{ cm}^3$) de dieta adicionados em copos de 50ml. Os bioensaios consistiram de 30 larvas por tratamento (3 larvas/copo), sendo realizados em triplicata. Quatro tratamentos foram testados: vírus + *P167*; vírus; *P167*; e água. Os dados dos bioensaios foram submetidos à análise de Probit (FINNEY, 1971) para determinação da concentração letal (CL_{50}) e tempo letal (TL_{50}) seguidos dos limites fiduciais e valores χ^2 . A atividade viral (A) foi calculada pela razão entre CL_{50} para o vírus e CL_{50} para o vírus+*P167*. Outros parâmetros foram avaliados, como percentual de mortalidade (%) e tempo de morte (TM), sendo este calculado de acordo com Morales et al. (2001).

Resultados e Discussão

Os parâmetros de mortalidade determinados neste trabalho mostraram que lagartas *A. gemmatilis* tratadas com dieta contendo vírus AgMNPV e branqueador *Blankophor P167* foram mais suscetíveis à infecção do que lagartas tratadas somente com vírus. Isso foi também observado em bioensaios relatados por Argauer e Shapiro (1997) onde vários branqueadores

ópticos, dentre eles o *Blankophor P167*, foram testados em combinação com o baculovirus *Lymantria dispar* NPV.

A análise dos dados dos bioensaios realizados com *A. gemmatalis* mostrou que o branqueador *P167* reduziu a CL50 de $3,05 \times 10^7$ OB/ml (somente vírus) para $7,80 \times 10^5$ OB/ml (tabela 1) e o TL50 foi reduzido em cerca de 4 dias nas diferentes concentrações virais testadas, exceto na maior concentração ($3,2 \times 10^7$ OB/ml) que a diferença foi de apenas 1,3 dias (tabela 2). A taxa de mortalidade e o tempo de morte médio (TM) também foram calculados verificando-se que a porcentagem de lagartas mortas pela infecção viral com branqueador foi aumentada em até mais de 2 vezes e o TM teve uma leve redução com variação de 0,2 a 1 dia (Tabela 3).

Comparativamente, o uso do branqueador proporcionou um aumento da atividade viral de 39 vezes com conseqüente aumento da velocidade de morte larval. Trabalhos anteriores demonstraram que algumas substâncias químicas são capazes de aumentar a permeabilidade da membrana peritrófica do intestino da lagarta rompendo esse sistema de defesa e facilitando assim a entrada de maior número de partículas virais (BRANDT et al., 1978; ELORZA et al., 1983; WANG e GRANADOS, 2000; ZHU et al., 2007).

Os resultados obtidos neste estudo indicam que o branqueador testado pode ser útil nas formulações de bioinseticidas derivados de AgMNPV, independentemente de sua ação como protetor de luz ultravioleta, característica não testada neste trabalho.

Referências Bibliográficas

Brandt, C. R., Adang, M. J., and Spence, K. D. (1978) The peritrophic membrane: Ultrastructural analysis and function as a mechanical barrier to microbial infection in *Orgyia pseudotsugata*. *J. Invertebr. Pathol.* 32, 12-24.

Dougherty, E.M.; Guthrie, K.P.; Shapiro, M.; 1996. Optical brighteners provide baculovirus activity enhancement and UV radiation protection. *Biological Control* 7, 71-74.

Elorza, M. V.; Rico, H.; Sentandreu, R. (1983). Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. *J. Gen. Microbiol.* 129:1577–1582.

Finney, D.J., 1971. Probit Analysis, first ed. Cambridge Press, Cambridge.

Federici, B.A. (1997) Baculovirus Pathogenesis. In: The Baculoviruses (L.K Miller, Ed.), p. 33-59. Plenum Press, New York (The viruses, series editors: H Fraenkel-Conrat & R.R. Wagner).

Hamm, J.J.; Shapiro, M.; 1992. Infectivity of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus enhanced by a fluorescent brightener. *Journal of Economic Entomology* 85, 2149-2152.

Johnson, D.W., Maruniak, J.E., 1989. Physical map of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus (AgMNPV-2D) DNA. *Journal of General Virology* 70, 1877-1883.

Maruniak, J.E. (1986) Baculovirus structural proteins and protein synthesis. In: Granados, R.R., Federici, B. A. (Ed). The Biology of Baculoviruses. CRC Press, Boca Raton .v.1, p.129-146.

Matinez, A M; Simón, O.; Williams, T.; Caballero, P. (2003). Effect of optical brighteners on the insecticidal activity of a nucleopolyhedrovirus in three instars of *Spodoptera frugiperda*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 109, 139-146.

Morales, L.; Moscardi, F.; Sosa-Gómez, D.R.; Paro, F.E.; Soldorio, I.L. (2001). Fluorescent brighteners improve *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) activity on AgMNPV susceptible and resistant strains of the insect. *Biological Control*. 20, 247-253.

Morales, L.; Moscardi, F.; Sosa-Gómez, D.R.; Paro, F.E.; Soldorio, I.L. (1997). Enhanced activity of *Anticarsia gemmatilis* Hub. (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus by boric acid in the laboratory. *An. Soc. Entomol. Brasil*. 26, 115-120.

Shapiro, M.; Argauer, R., 2001. Relative effectiveness of selected stilbene optical brighteners as enhancers of the beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus. *Biological and Microbial Control*. 94, 339-343.

Shapiro, M.; Robertson, J.L.. 1992. Enhancement of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus activity by optical brighteners. *Journal of Economic Entomology* 85, 1120-1124.

Sheppard, C.A.; Shapiro, M.; Vaughn, J.L.; 1994. Reduction of midgut luminal pH in gypsy moth larvae (*Lymantria dispar* L.) following ingestion of nuclear or cytoplasmic polyhedrosis virus/fluorescent brightener on natural and artificial diets. *Biological Control* 4, 412-420.

Souza, M. L.; Castro, M. E. B.; Sihler W.; Ribeiro, M. Z. A.; Moscardi, F. Metodologias para Caracterização de Vírus de Insetos. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 13p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 13).

Theilmann, D.A., Blissard, G.W., Bonning, B., Jehle, J., O'reilly, D.R., Rhormann, G. F., Thiem, S. & Vlak, J.M. (2005). In: *Baculoviridae. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. Fauquet, C. M.; Mayo, M.A.; Maniloff, J.; Desselberger, U.; Ball, L.A. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. 1259p. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press. p.177- 186.

Wang, P.; Granados, R. R. (2000). Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30: 135-143.

Washburn, J. O; Kirkpatrick, B.A.; Haas-Stapelton, E.; Volkman, L.E. (1998). Evidence that the stilbene-derived optical brightener M2R enhances *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus infection of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens* by preventing sloughing of infected midgut epithelial cells. *Biological Control* 11, 59-69.

[Zhu R](#), [Liu K](#), [Peng J](#), [Yang H](#), [Hong H](#). (2007). Optical brightener M2R destroys the peritrophic membrane of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. [Pest Manag Sci](#). 63, 296-300.

Tabela 1. Concentração letal média (CL₅₀) em lagartas *A. gemmatalis* infectadas pelo vírus AgMNPV combinado com *Blankophor P167* determinada por análise de Probit.

Vírus	CL ₅₀ (OB/ml)	Limites Fiduciais (95%)	Slope	χ^2
AgMNPV-2D + P167	7,8x10 ⁵	126034,69 - 2056918,72	0.57	1.46
AgMNPV-2D	3,05x10 ⁷	4114227,8 - 5887510,5	0.77	3.18

*CL₅₀ determina a concentração viral necessária para matar metade da população de larvas infectadas.

Tabela 2. Tempo letal médio (TL₅₀) de lagartas *A. gemmatalis* infectadas pelo vírus AgMNPV combinado com *Blankophor P167* determinado pela análise de Probit.

Vírus	Concentração (OB/ml)	TL ₅₀ (dias)	Limites fiduciais (95%)	Slope	χ^2
AgMNPV-2D + P167	2,6x10 ⁵	10,01	8.65-12.65	6.97	18,53
	1,3x10 ⁶	9,41	8.42-11.19	3.89	5,14
	6,5x10 ⁶	8,50	7.52-10.11	8.40	23,34
	3,2x10 ⁷	5,70	4.93-6.32	4.03	4,64
AgMNPV-2D	2,6x10 ⁵	13,85	11.81-16.10	6.37	6,47
	1,3x10 ⁶	13,51	11.78-16.71	5.40	11,26
	6,5x10 ⁶	12,66	11.25-15.36	6.30	6,68
	3,2x10 ⁷	7,01	6.14-8.65	11.33	36,30

Tabela 3. Tempo de morte médio (TM) e taxa de mortalidade de lagartas *A. gemmatalis* infectadas pelo vírus AgMNPV combinado com *Blankophor*

Vírus	Concentração (OB/ml)	TM (dias)	Mortalidade (%)
AgMNPV-2D + P167	2,6x10 ⁵	6,77	44,44
	1,3x10 ⁶	6,32	49,99
	6,5x10 ⁶	6,84	64,44
	3,2x10 ⁷	6,13	85,55
AgMNPV-2D	2,6x10 ⁵	7,59	21,10
	1,3x10 ⁶	6,49	22,22
	6,5x10 ⁶	7,85	27,77
	3,2x10 ⁷	6,37	75,55